

# PRZYDATNOŚĆ MARKERÓW MOLEKULARNYCH DO WERYFIKACJI TOLERANCJI MIESZAŃCÓW MIĘDZYGATUNKOWYCH AŁYCZY, MORELI I ŚLIWY JAPOŃSKIEJ NA BRUNATNĄ ZGNILIZNĘ DRZEW PESTKOWYCH



ANITA KURAS, MAREK SZYMAJDA, RENATA CZARNECKA  
INSTYTUT OGRODNICTWA – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
UL. KONSTYTUCJI 3 MAJA 1/3, 96-100 SKIERNIEWICE



## WSTĘP

Drzewa owocowe z rodzaju *Prunus* są bardzo ważnymi gospodarczo gatunkami klimatu umiarkowanego. Dlatego w różnych ośrodkach badawczych prowadzone są badania, których celem jest uzyskanie odmian o podwyższonej tolerancji na choroby. Brunatna zgnilizna, wywoływana przez *Monilinia spp.*, jest jedną z najważniejszych ekonomicznie chorób gatunków drzew owocowych należących do rodzaju *Prunus*. Ta ogólnoswiatowa choroba może prowadzić do poważnych strat plonów zarówno przed, jak i po zbiorach. W Stanach Zjednoczonych *M. fructicola* jest dominującym gatunkiem powodującym brunatną zgniliznę drzew pestkowych, podczas gdy *M. laxa* i *M. fructigena* są grzybami sprawczymi w Europie. Aby wytworzyć nowe odmiany, wykazujące małą podatność na brunatną zgniliznę drzew pestkowych, niezbędna jest identyfikacja genów lub loci związanych z odpornością, co umożliwiłoby stworzenie nowych narzędzi do wczesnej selekcji genotypów hodowlanych o zwiększonej tolerancji na brunatną zgniliznę drzew pestkowych. Dotychczasowe badania ujawniły poligeniczny i ilościowy charakter tolerancji/podatności na brunatną zgniliznę drzew. Zważywszy na długoletni okres juwenilny roślin drzew owocowych, trwający 3-5 lat, zastosowanie w hodowli markerów molekularnych znacznie przyspieszy ocenę i selekcję wytworzonych materiałów roślinnych we wczesnym etapie ich wzrostu. W przeprowadzonych badaniach wytypowano z dostępnych baz markery skorelowane z regionami warunkującymi tolerancję/odporność na grzyba wywołującego brunatną zgniliznę drzew pestkowych do rozróżnienia genotypów skrajnych pod względem badanej cechy.

Celem badań jest ocena przydatności markerów molekularnych do selekcji mieszańców międzygatunkowych ałyczy, śliwy japońskiej i moreli pod kątem ich tolerancji/podatności na brunatną zgniliznę drzew pestkowych (*Monilinia sp.*).

## MATERIAŁY I METODY

### MATERIAŁ ROŚLINNY:

LP.	RODOWÓD SIEWKI	TOLERANCJA/PODATNOŚĆ	KRZYŻOWANE GATUNKI
1	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	ałycza × morela
2	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	
3	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	
4	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	
5	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	
6	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	tolerancyjny	(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska
7	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	bardzo podatny	ałycza × morela
8	'Amelia' × 'Sirena'	tolerancyjny	
9	'Amelia' × 'Sirena'	podatny	
10	'Amelia' × 'Sirena'	średnio podatny	
11	'Amelia' × 'Sirena'	podatny	
12	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	tolerancyjny	(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska
13	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	tolerancyjny	
14	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	tolerancyjny	
15	'Najdiena' × 'Blue Gigant'	tolerancyjny	

### IZOLACJA DNA

Doyle & Doyle (1990)



### OCENA JAKOŚCI DNA



SPEKTROFOTOMETR  
(Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech)

### AMPLIFIKACJA DNA METODĄ SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEAT)



- Do testów zastosowano genotypy o potwierdzonej po testach fitopatologicznych tolerancji/podatności na grzyby z rodzaju *Monilinia spp.*
- W przedstawionych badaniach zastosowano markery zlokalizowane w regionach LG1, LG2, LG3 i LG4.
- Sprawdzono przydatność 20 par oligonukleotydów do oceny mieszańców ałyczy, moreli i śliwy japońskiej na brunatną zgniliznę drzew pestkowych.
- Do weryfikacji przydatności markerów opisanych jako skorelowanych z regionami warunkującymi tolerancję/podatność na grzyby z rodzaju *Monilinia spp.*

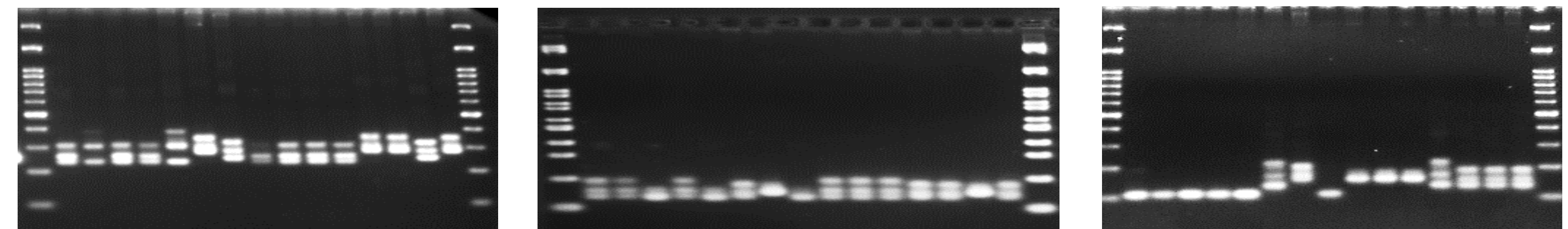
SKORELOWANIE DANYCH Z BADANĄ CECHĄ

WYTYPOWANIE MARKERA SKORELOWANEGO Z BADANĄ CECHĄ DO SELEKCJI MIESZAŃCÓW Z RODZAJU *PRUNUS*

## WYNIKI

### POLIMORFIZM DNA

- Zastosowano oligonukleotydy z dostępnych baz danych dla rodzaju *Prunus* występujące w regionach LG1, LG2, LG3 i LG4 genomu skorelowanym z badaną cechą.
- Ocenie metodą SSR poddano 15 siewek mieszańcowych, użyto 20 par oligonukleotydów, specyficznych dla analizowanego genomu, przeprowadzono 900 reakcji amplifikacji.
- Trzy z dziesięciu testowanych oligonukleotydów było monomorficznych.
- W reakcjach z 20. parami oligonukleotydów uzyskano 83 polimorficznych amplikonów o długości od 80 do 280 pz.



Przykładowe elektroforogramy produktów amplifikacji 15 roślin mieszańcowych z testowanymi parami oligonukleotydów

### OCENA REGIONU GENOMU SPRZĘŻONEGO Z BADANĄ CECHĄ NA WYTYPOWANYCH MIESZAŃCACH MIĘDZYGATUNKOWYCH AŁYCZY, MORELI I ŚLIWY JAPOŃSKIEJ

- W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem BPPCT02 obserwowano allel o długości 200 pz tylko u genotypów tolerancyjnych, ale u sześciu z dziesięciu testowanych.
- W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem BPPCT013, obserwowano allele o długości 150 pz tylko u mieszańców tolerancyjnych na brunatną zgniliznę drzew pestkowych, natomiast fragment DNA o długości 160 pz występował na matrycy DNA roślin podatnych i średnio podatnych.
- W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem BPPCT004, zlokalizowanym na LG3, obserwowano fragment o długości 180 pz tylko u genotypów tolerancyjnych, ale u połowy z dziesięciu testowanych.
- W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem BPPCT001, obserwowano allele o długościach 120 i 170 pz na matrycy DNA wszystkich testowanych roślin podatnych i średnio podatnych na brunatną zgniliznę drzew pestkowych.
- W reakcjach amplifikacji z pozostałymi szesnastoma oligonukleotydami uzyskane wyniki nie są znacząco skorelowane z badaną cechą, allele występują zarówno u genotypów tolerancyjnych, jak i niektórych wrażliwych/podatnych.

NAZWA STARTERA	DŁUGOŚĆ (pz)	ANALIZOWANE GENOTYPY														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
BPPCT001	120															
	130															
	140	+	+	+	+	+										
	150															
	170															
BPPCT002	180															
	190															
	200	+	+	+	+	+										
	240															
	260	+	+	+	+	+										
BPPCT004	180	+	+	+	+	+										
	190															
	200															
	260	+	+	+	+	+										
	270															
BPPCT007	150	+	+	+	+	+										
	180															
	190															
BPPCT008	120	+	+	+	+	+										
	130															
	140															
	150															
	170															
BPPCT012	180															
	110	+	+	+	+	+										
	120															
	130															
	150															
BPPCT013	150	+	+	+	+	+										
	160															
	180	+	+	+	+	+										
	190															
BPPCT014	190	+	+	+	+	+										
	200															
	240	+	+	+	+	+										
	250															

### WNIOSKI

- Marker BPPCT001 wydaje się znacząco skorelowany z badaną cechą, umożliwia rozróżnienie badanych genotypów pod względem tolerancji i podatności na grzyby z rodzaju *Monilinia*. Istnieje konieczność weryfikacji przydatności wytypowanego markera do selekcji na innej grupie roślin.
- Pozostałe badane markery (dziewiętnaście z dwudziestu testowanych) do weryfikacji siewek mieszańcowych pod względem tolerancji/podatności na grzyby z rodzaju *Monilinia* nie są znacząco skorelowane z badaną cechą.

Fragment tabeli przedstawiający profile genetyczne uzyskane w reakcji amplifikacji z testowanymi oligonukleotydami metodą SSR dla 15 genotypów mieszańcowych z rodzaju *Prunus*

Badania wykonano w ramach Badań Podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 47 „Badania nad możliwością wytworzenia nowych genotypów owocowych drzew pestkowych z wykorzystaniem hybrydyzacji oddalanej w rodzaju *Prunus*”.